

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

In re Patent Application of:  
Masaru Furuta

Application No.: NEW APPLICATION

Confirmation No.: N/A

Filed: November 4, 2003

Art Unit: N/A

For: LASER DESORPTION IONIZATION MASS  
SPECTROMETRIC METHOD AND SAMPLE PLATE  
USED IN SUCH A METHOD

Examiner: Not Yet Assigned

**CLAIM FOR PRIORITY AND SUBMISSION OF DOCUMENTS**

MS Patent Application  
Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

Dear Sir:

Applicant hereby claims priority under 35 U.S.C. 119 based on the following prior foreign application filed in the following foreign country on the date indicated:

<u>Country</u>	<u>Application No.</u>	<u>Date</u>
Japan	2002-326655	November 11, 2002

In support of this claim, a certified copy of the said original foreign application is filed herewith. Applicant believes no fee is due with this response. However, if a fee is due, please charge our Deposit Account No. 18-0013, under Order No. NOG-0018 from which the undersigned is authorized to draw.

Dated: November 4, 2003

Respectfully submitted,

By 

David T. Nikaido

Registration No.: 22,663

Carl Schaukowitch

Registration No.: 29,211

RADER, FISHMAN & GRAUER PLLC

1233 20th Street, N.W., Suite 501

Washington, DC 20036

(202) 955-3750

Attorney for Applicant

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日            2 0 0 2 年 1 1 月 1 1 日  
Date of Application:

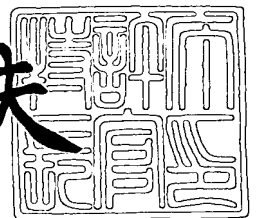
出 願 番 号            特 願 2 0 0 2 - 3 2 6 6 5 5  
Application Number:  
[ST. 10/C]:            [ J P 2 0 0 2 - 3 2 6 6 5 5 ]

出      願      人            株 式 会 社 島 津 製 作 所  
Applicant(s):

2 0 0 3 年   8 月 2 7 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号   出証特 2 0 0 3 - 3 0 6 9 8 3 5

【書類名】 特許願

【整理番号】 K1020386

【提出日】 平成14年11月11日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 35/00

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市中京区西ノ京桑原町 1 番地 株式会社島津  
製作所内

【氏名】 古田 大

【特許出願人】

【識別番号】 000001993

【氏名又は名称】 株式会社島津製作所

【代理人】

【識別番号】 100085464

【弁理士】

【氏名又は名称】 野口 繁雄

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 037017

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9110906

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 レーザー脱離イオン化質量分析方法とそれに用いるサンプルプレート

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 質量分析装置に装着されたサンプルプレート上に配置された試料にレーザー光を照射することにより試料をイオン化して分析するレーザー脱離イオン化質量分析方法において、

平板金属プレート上にあらかじめメンブレンを固着したものをサンプルプレートとして用意しておき、

前記メンブレンに試料を固相化するステップ、

メンブレンに固相化した試料に試薬を分注して固相化試料の修飾反応を行なうステップ、及び

修飾反応後のサンプルプレートを質量分析装置に装着してレーザー脱離イオン化質量分析方法により分析するステップを備えたことを特徴とするレーザー脱離イオン化質量分析方法。

【請求項 2】 前記修飾反応後、サンプルプレートを質量分析装置に装着する前に、固相化された試料にマトリックス溶液を分注するステップをさらに備え、マトリックス支援型レーザー脱離イオン化方法によりイオン化を行なう請求項 1 に記載のレーザー脱離イオン化質量分析方法。

【請求項 3】 メンブレンへの試料の固相化ステップは、試料が展開された媒体をサンプルプレート上の前記メンブレンに重ねて配置し、前記媒体とメンブレン間に電圧を印加することにより試料を前記媒体からメンブレンに転写する方法により行なう請求項 1 又は 2 に記載のレーザー脱離イオン化質量分析方法。

【請求項 4】 平板金属プレート上にあらかじめメンブレンを固着したことを特徴とするサンプルプレート。

【請求項 5】 前記金属プレートは均質な平面を有し、前記メンブレンを、導電性物質を介在させて前記金属プレートの前記平面に密着して固着した請求項 4 に記載のサンプルプレート。

【発明の詳細な説明】

**【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、臨床、診断、生化学、分子生物学などの分野において、メンブレン上に展開して固相化された物質をレーザー脱離イオン化質量分析法により分析する方法とそれに用いるサンプルプレートに関するものである。

**【0002】****【従来の技術】**

対象分子の質量を分析する目的で、質量分析装置に装着されたサンプルプレート上に配置された試料にレーザー光を照射することにより試料をイオン化して分析するレーザー脱離イオン化質量分析方法が行なわれている。試料をサンプルプレート上に配置して作成する際、マトリックスを使用する方法と、使用しない方法がある。

**【0003】**

マトリックスを使用する方法を飛行時間型質量分析装置と組み合わせた方法は、MALDI-TOF（マトリックス支援型レーザー脱離イオン化-飛行時間）質量分析方法と呼ばれている。

**【0004】**

MALDI-TOF質量分析法は、低分子量から高分子量分子まで迅速かつ高感度に分析を行うことが可能な手法である。このため特にタンパク質、ペプチド、核酸等の生体試料分析に能力を発揮している。

**【0005】**

測定サンプルが混合物である場合には、通常はサンプルはゲル電気泳動により分離された上で対象分子を選択し、各種反応後ゲルから抽出したうえでマトリックス溶液とともに金属製サンプルプレートに配置される。

**【0006】**

一方、対象試料としては、生体分子を電気泳動等により分離した後、メンブレンに転写して固相化し、そのメンブレンに固相化された試料に対しピエゾ素子による微量分注技術を利用してメンブレン上で各種反応を行い生成する反応産物を利用して質量分析する方法が提唱されている（特許文献1参照。）。

## 【0007】

## 【特許文献1】

国際公開第WO98/47006号パンフレット

## 【特許文献2】

特開平10-40858号公報

## 【非特許文献1】

「分析」No.4、pp.253~261(1996年)

## 【0008】

## 【発明が解決しようとする課題】

ゲル電気泳動により分離した試料をメンブレンに転写し、各種試薬を微量分注して反応させ、質量分析装置に導入する系を実現するためには、各ステップ又はステップ間の移行時において煩雑な操作を要する。すなわちそれぞれの操作は別個独立したものであり、これらに一貫した互換性は与えられていない。そのため、試料を固相化したメンブレンは、転写装置から外されて微量分注用ステージに移され、さらにその後質量分析用のサンプルプレートに固定化されることになるため、それぞれの段階においてメンブレンの支持体を変更する必要がある。

## 【0009】

ここでは、MALDI-TOF測定用に試料を調製する場合を説明したが、マトリックスを用いなくて試料を調製する場合も同様の問題がある。

本発明は、マトリックスを用いる場合も用いない場合も含めて、メンブレンの支持体を統一し、試料を調製する際の一連の操作における省力化を図ることを目的とするものである。

## 【0010】

## 【課題を解決するための手段】

上記目的を達成するために、本発明では、あらかじめ金属プレートにメンブレンを貼り付けたものを用意し、ゲルからのサンプル転写、試薬の分注及び反応、質量分析の一連の操作においてメンブレン支持体を変更する必要を排除する。

## 【0011】

すなわち、本発明のレーザー脱離イオン化質量分析方法は、平板金属プレート

上にあらかじめメンブレンを固着したものをサンプルプレートとして用意しておき、前記メンブレンに試料を固相化するステップ、メンブレンに固相化した試料に試薬を分注して固相化試料の修飾反応を行なうステップ、及び修飾反応後のサンプルプレートを質量分析装置に装着してレーザー脱離イオン化質量分析方法により分析するステップを備えている。

#### 【0012】

また、本発明のサンプルプレートは、レーザー脱離イオン化質量分析方法で用いられるものであり、平板金属プレート上にあらかじめメンブレンを固着したものである。

#### 【0013】

このように、メンブレンはあらかじめ金属プレートに固定されたままで他に移しかえる必要がないため、当該プレートはゲルからのサンプル転写時には電極として、試薬やマトリックス溶液の分注時には装置内のサンプル保持ステージとして、質量分析時にはサンプルプレートとして機能する。

#### 【0014】

試料のイオン化の好ましい一方法は、マトリックス支援型レーザー脱離イオン化方法である。その場合、前記修飾反応後、サンプルプレートを質量分析装置に装着する前に、固相化された試料にマトリックス溶液を分注するステップをさらに備えている。

#### 【0015】

メンブレンへの試料の固相化ステップの好ましい一例は、試料が展開された媒体をサンプルプレート上のメンブレンに重ねて配置し、その媒体とメンブレン間に電圧を印加することにより試料をその媒体からメンブレンに転写する方法により行なう方法である。

#### 【0016】

サンプルプレートの好ましい一例は、金属プレートが均質な平面を有し、メンブレンを、導電性物質を介在させてその金属プレートのその均質な平面に密着して固着したものである。

#### 【0017】

メンブレンに固相化される試料の例は、S D S（ドデシル硫酸ナトリウム）ポリアクリルアミド電気泳動、又は等電点電気泳動及びS D Sポリアクリルアミド電気泳動の組合わせによる二次元電気泳動、又はその他のクロマトグラフィーによって分離されたタンパク質、ペプチド、糖、脂質、核酸等の分子又はそれらの混合物である。

#### 【0 0 1 8】

これらの試料は、タンパク質分解酵素、糖分解酵素、ヌクレアーゼ又はそれらの組合わせ等により修飾を受けることができる。

固相化に使用されるメンブレンの材質としては、P V D F（polyvinylidene difluoride）、ニトロセルロース、ナイロン（登録商標）又はその派生物等を挙げることができる。

#### 【0 0 1 9】

メンブレンに固相化された試料は、他の生体試料を介したり、発色試薬、蛍光試薬、金属、紫外光の使用又はこれらの組合わせ等によりメンブレン上にて視覚化してもよい。

#### 【0 0 2 0】

##### 【発明の実施の形態】

図 1 に一実施例のサンプルプレート 2 を示す。（A）は平面図、（B）はその図で横方向に切断した状態での断面図を分解図として示す。

サンプルプレート 2 は金属プレート 4 4 に導電性のある状態でメンブレン 4 8 が固定されている。

#### 【0 0 2 1】

金属プレート 4 4 としては、ステンレス板が用いられ、メンブレン 4 8 が固定されている表面は均質な平坦面であり、メンブレン 4 8 が密着することが可能である。メンブレン 4 8 の固定には、一例として導電性両面テープ 4 6 が用いられている。

サンプルプレート 2 は質量分析用のプレートを兼ねている。

#### 【0 0 2 2】

電気泳動ゲルなどの媒体に展開された試料をメンブレン 4 8 に転写する際は、



通常のプロットイング操作と同様に行なう。その状態を図2に示す。平板電極52, 54間にゲルなどの媒体50とこのサンプルプレート2を、媒体50とメンブレン48が密着するように挟み込む。その際、プロットイング装置の平板電極52, 54と金属プレート44とを密着させ、また転写中に電解質溶液を保持するために、同溶液で湿らせたろ紙等56を複数枚重ねて平板電極52と金属プレート44との間に挟み込み、ろ紙等58を平板電極54と媒体50との間に挟み込む。

#### 【0023】

プロットイング操作時には、金属プレート44を平板電極52と同電位になるように導線60で接続し、平板電極52がプラス、平板電極54がマイナスになるように両電極52, 54間に電圧を印加する。これにより、ゲルなどの媒体50に展開されていた試料が電気泳動によりメンブレン48に転写される。

#### 【0024】

本発明のサンプルプレートを用いて作製した試料は、レーザー脱離イオン化質量分析装置で分析される。レーザー脱離イオン化質量分析装置は、サンプルのみ又はサンプルとマトリックスとの混合物が分析対象物として設置されるイオン化室、その分析対象物にレーザー光を照射してサンプルをイオン化するレーザー照射光学系、及びイオン化されたサンプルイオンを引き出し質量数に応じて分離検出する質量分析部を備えている。レーザー脱離イオン化質量分析装置では、分析対象物に窒素ガスレーザー（波長337nm）、Nd-YAGレーザー（波長266nm又は355nm）、炭酸ガスレーザー（波長1060nm、2.94μm）などのレーザー光を照射してサンプルをイオン化し、そのイオン化されたサンプルを質量分析部に導いて分析する。この分析方法は、レーザー光を光学レンズにより直径数μmまで集光できることから、微小部分の分析が可能なものとして注目されている。

#### 【0025】

分析対象物がサンプルのみの場合は、サンプル自身がレーザー光を吸収することによりレーザー光から直接エネルギーを得てイオン化する。一方、マトリックスを用いる場合は、マトリックスがレーザー光を吸収して熱エネルギーに変換し

、マトリックスの一部が急速に加熱されてサンプルとともに気化する。この場合サンプル分子が中性のままで脱離しても、同時に帰化されたプロトンや陽イオン（不純物として存在）、又はマトリックスイオンがサンプル分子に付加すればサンプルイオンとなる。レーザー光は1ナノ秒程度のパルスレーザー光として照射するのが好ましい。

#### 【0026】

マトリックスを用いる場合のサンプル調製は、サンプル溶液とマトリックス溶液をモル比で1:100～1:10000で混合した後、乾燥させ、両者がミクロンレベルで均一に混合された状態を作る。その結果、サンプルの微細な結晶を多量のマトリックス結晶が取り囲んだ結晶状態又はアモルファス状態となっている。一般にはこの分析対象物には不純物として、又は予め添加された陽イオンや陰イオンが含まれている。

#### 【0027】

レーザー脱離イオン化質量分析に用いられる質量分析部としては、飛行時間型質量分析装置（TOFMS）が用いられるが、フーリエ変換型イオンサイクルترون共鳴質量分析計（FTMS）、磁場と電場を用いてイオンを選別して検出器に導く二重収束型質量分析計（ダブルフォーカスMS）、三次元四重極型イオントラップ質量分析計等も使用することができる。

#### 【0028】

レーザー脱離イオン化を飛行時間型質量分析装置と組み合わせれば分子量では免疫グロブリンM（平均分子量900kDa）まで検出でき、検出限界もamolレベルに達していると言われている。また、イオン化が可能な化合物はペプチド、タンパク質、多糖類、複合脂質、核酸関連物質等の生体関連物質一般、合成ポリマー、オリゴマー、金属配位化合物や無機化合物まで広範囲に及んでいる。

#### 【0029】

マトリックスを用いる場合、そのマトリックスとしては種々のものが使用されており、例えばニコチン酸、2-ピラジニカルボン酸、シナピン酸、2,5-ジヒドロキシ安息香酸、5-メトキシサリチル酸、 $\alpha$ -シアノー-4-ヒドロキシケイ皮酸、3-ヒドロキシピコリン酸、ジアミノナフタレン、2-(4-ヒドロキ

シフェニラゾ)安息香酸、ジスラノール、コハク酸、5-(トリフルオロメチル)ウラシル、グリセリンなどを使用することができる(非特許文献1参照。)

### 【0030】

図3にMALDI-TOF質量分析装置の一例を示す。

イオン化室にはサンプルプレート2に乘せられた分析対象物4が設置されている。分析対象物4はこの場合、試料とマトリックスとの混合物とする。試料をイオン化するための窒素レーザー(波長337nm)6からのレーザービームを分析対象物4に集光して照射するために、ミラー8、そのミラー8で折り曲げられたレーザー光を集光する光学レンズ10及びレーザー光の不要な高調波等を除去するための光学フィルター11が配置されている。

### 【0031】

イオン化された試料イオンを分析するための質量分析部として、飛行時間型質量分析計が設けられている。その質量分析計は、分析対象物4に接近してイオンを引き出すためのイオンレンズ22、そのイオンレンズ22で引き出されたイオンを検出器の方向に導いたり、検出器の方向から外れた方向に導くための偏向板24、その偏向板24を通過したイオンが入射して検出される検出器26を備えている。

### 【0032】

検出器26からのイオン検出信号はAD変換器32に導かれる。飛行時間型質量分析装置では飛行時間を測定するための時間の原点(ゼロ点)を定めるために、窒素レーザー6にはフォトダイオード34が設けられ、そのフォトダイオード34の検出信号がスタート信号としてAD変換器32に導かれる。AD変換器32ではスタート信号を時間の原点として検出器26の信号をデジタル信号に変換する。36はAD変換器32でデジタル信号に変換された検出器信号を入力してデータ処理をしたり、この分析装置全体の動作を制御するホストコンピューターである。

### 【0033】

次に、このMALDI-TOF質量分析装置の動作について説明する。

レーザー光はフィルター11で調光され、レンズ10で集光されて分析対象物

4に照射され、イオン化が行なわれる。発生したサンプルイオンはサンプルプレート2に印加された電圧 $V_0$ とイオンレンズ22の分析対象物側のグラウンド電位とによって引き出され、その引き出されたイオンは次段のイオンレンズに印加された電圧 $V_L$ によって平行飛行をする。偏向板24の電位 $V_D$ がグラウンド電位であるときは、イオンが直線飛行して検出器26に到達し検出される。

#### 【0034】

偏向板24に電位 $V_D$ を印加すれば、イオンは曲げられて検出器26には到達しなくなる。

イオンは検出器26で検出されて増幅された後、レーザー発振時点を飛行時間の原点としてAD変換器32によってデジタル信号に変換され、ホストコンピューター36に導かれて分析がなされる。

レーザー6は分析部20の真空系の外部に設置し、真空系の光導入窓を通して導入する。

#### 【0035】

##### 【発明の効果】

従来ブロッティングにより試料を固相化するメンブレンの取扱いは、メンブレンが脆弱で損傷しやすいことや、各ステップでメンブレンを固定化支持体に気泡等を含めぬよう密着させるのに技量を要するなどのため、煩雑な操作を伴う時間のかかる作業であった。本発明では、メンブレンは一貫して金属プレート上に密着して固定されたままであり、ゲルなどの媒体から試料転写から試薬の分注、質量分析に至る一連の操作において大幅な省力化を図ることができる。

##### 【図面の簡単な説明】

#### 【図1】

一実施例のサンプルプレートを示す。(A)は平面図、(B)はその図で横方向に切断した状態での分解断面図である。

#### 【図2】

同実施例のサンプルプレートを用いたブロッティング工程を示す断面分解図である。

#### 【図3】

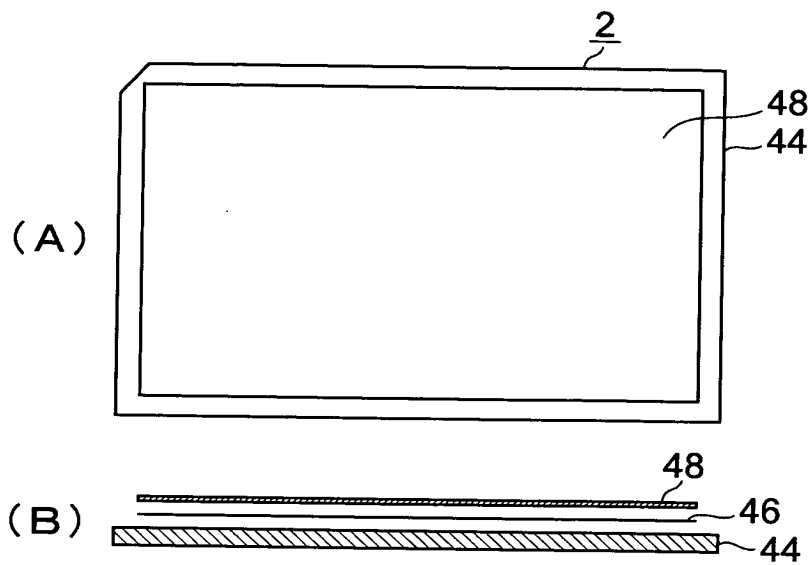
MALDI-TOF 質量分析装置の一例を示す概略構成図である。

【符号の説明】

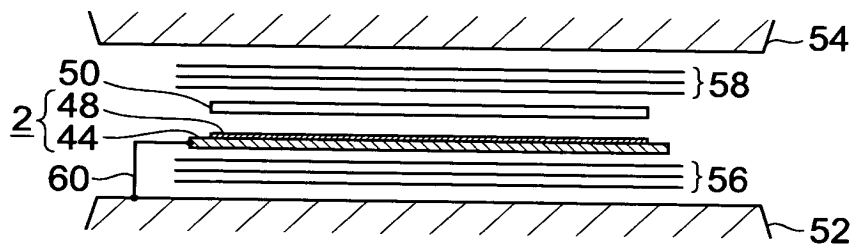
- |     |          |
|-----|----------|
| 2   | サンプルプレート |
| 4 4 | 金属プレート   |
| 4 6 | 導電性両面テープ |
| 4 8 | メンブレン    |

【書類名】 図面

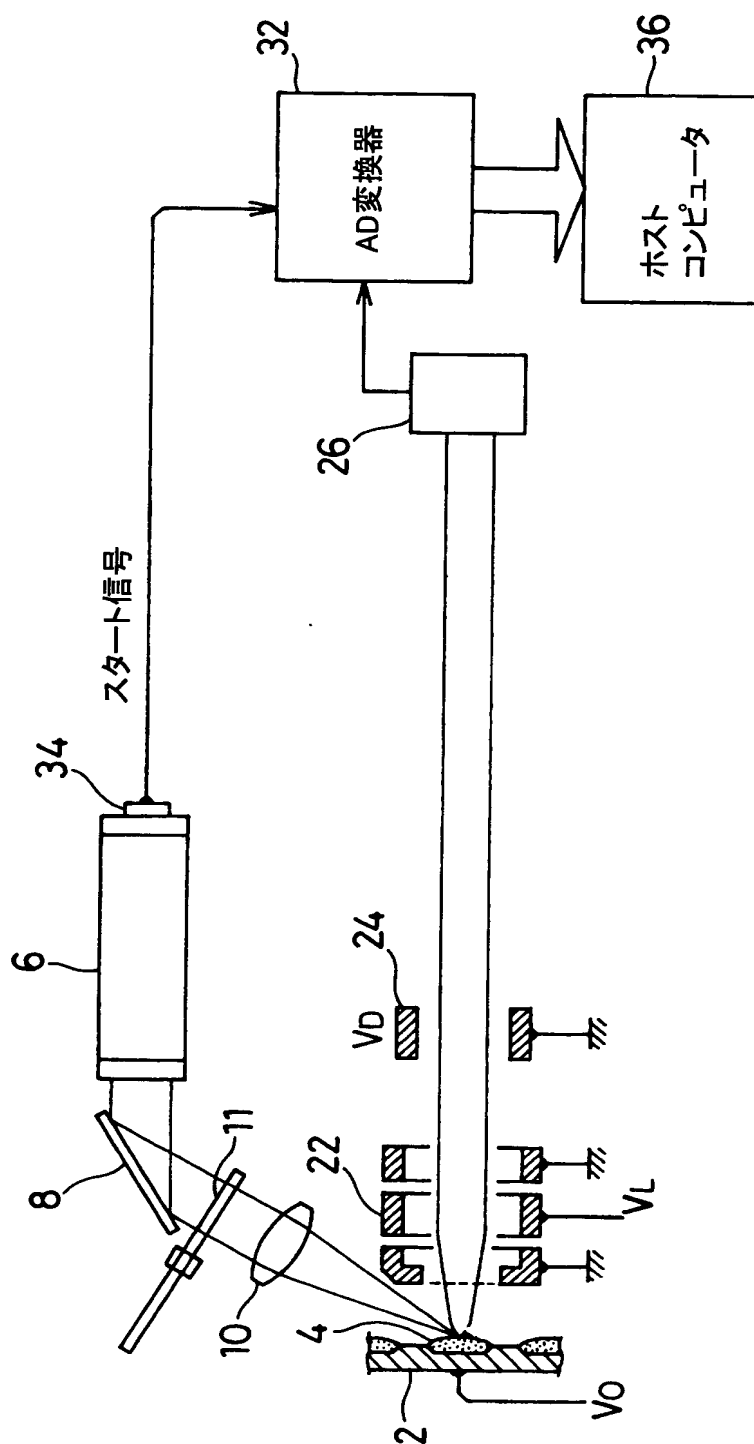
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 試料を調製する際の一連の操作における省力化を図る。

【解決手段】 サンプルプレート 2 は金属プレート 4 4 に導電性両面テープ 4 6 によりメンブレン 4 8 が固定されている。電気泳動ゲルなどの媒体に展開された試料をメンブレン 4 8 に転写する際は、通常のプロッティング操作と同様に、平板電極間にゲルなどの媒体とこのサンプルプレート 2 を、媒体とメンブレン 4 8 が密着するように挟み込み、両電極 5 2, 5 4 間に電圧を印加する。これにより、ゲルなどの媒体 5 0 に展開されていた試料が電気泳動によりメンブレン 4 8 に転写される。レーザー脱離イオン化質量分析の際には、サンプルプレート 2 は質量分析用のプレートを兼ねる。

【選択図】 図 1



特願 2 0 0 2 - 3 2 6 6 5 5

出 願 人 履 歷 情 報

識別番号

[ 0 0 0 0 0 1 9 9 3 ]

1 . 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 2 7 日

[変更理由]

新規登録

住 所

京都府京都市中京区西ノ京桑原町 1 番地

氏 名

株式会社島津製作所

2 . 変更年月日

2 0 0 3 年 5 月 1 6 日

[変更理由]

名称変更

住所変更

住 所

京都府京都市中京区西ノ京桑原町 1 番地

氏 名

株式会社島津製作所